The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Isolation of flat revertants from human papillomavirus type 18 E6 E7 transformed 3Y1 cells by transfection with a rat embryo fibroblast cDNA expression library
Author(s)	中西, 一吉
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38924
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名	中西一吉（なかにしかずよし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　11275　号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科病理系専攻
学　位　論　文　名	**Isolation of flat revertants from human papillomavirus type18 E6E7 transformed 3Y1 cells by transfection with a rat embryo fibroblast cDNA expression library** **（ラット初代培養線維芽細胞cDNA発現ライブラリーの形質導入によるヒトパピローマウイルス18型E6E7でトランスフォームした3Y1からのフラットリバータントの単離）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　羽倉　明 （副査） 教　授　山西　弘一　　教　授　上田　重晴

論文内容の要旨

【目的】

ヒトパピローマウイルス（HPV）の癌遺伝子であるE6E7遺伝子は，継代培養細胞（rat established cell line F2408）を癌化できるが，初代培養細胞（rat embryo fibroblast REF）に対して，不死化き起こすが癌化はさせない。

われわれはHPV16E6E7で癌化したF2408細胞とREFを細胞融合させることにより，REFにはE6E7の癌化を抑制できる遺伝子の存在する可能性を以前に示した。今回，これらの遺伝子を単離する目的で，REFのcDNA expression libraryを作製し，これをE6E7により癌化した細胞18T3Y1に形質導入した。

【方法ならびに成績】

18T3Y1にREF cDNA libraryを形質導入し，G418選択ののちプールした。プールした細胞を，癌形質をもつ細胞を選択的に死滅させる薬剤であるcis-hydroxy-proline 150μg/mlによって処理し生存したコロニーより33のflatなクローンをえた。そのうち18クローンではE6E7 mRNAは親株と変化なかった。18クローンのうち形態および軟寒天倍地での増殖性において安定な非癌化形質をもつものは12クローンであった。neo geneをプローブとしてSouthern blotを行った結果，12クローンのうち2組はsiblingであると考えられたため，最終的に独立した10クローンのrevertantをえた。これら10種のrevertant細胞と18T3Y1の細胞融合を行った結果，非癌化形質が優性であった。marker rescue法により，これらの細胞からcDNA plasmidを回収した。pcD2 vectorのone cut enzymeであるSal Iよりも，no cut enzymeで互いに連結可能なNhel, Spel, Xbalの3種の酵素の組み合せて消化後にligationを行った方が効率よく回収できた。

revertantの1つであるR31より回収したcDNA plasmid,p31XN7は，R31x18T3Y1 hybrid cellおよび長期培養後のR31の軟寒天培地中でコロニー形成能を再び獲得したクローンにおいて，選択的に欠失していた。31XN7 cDNAをプローブとしてlibrayをスクリーニングし，1.5kbのcDNAをもつN31を回収した。REFでは1.0kb，1.7kbの2つのsizeのmRNAが認められるので，1.5kbのcDNAは全長に近いものと考えられた。sequenceの結果，N31とp31XN7 cDNAのDNA配列は重複部分では一致していた。N31は各frameに終止コドンを多数含み，短いopen reading frameしか持たなかった。各種のゲノムDNAに対するSouthern blotの結果，N31遺伝子は種間で保存されていると考えられた。N31は3′側にmRNA degradation motifであるATTTAを含んでいた。このmotifを含むSphl以下の3′側を欠損させSR α promoterによりN31を過剰発現させたところ18T3Y1の軟寒天倍地でのコロニー

形成能は減少した。

【総括】

株化細胞と異なり初代培養細胞はHPVの癌遺伝子であるE6E7だけでは癌化しない。また初代培養細胞とE6E7で癌化した株化細胞の融合細胞においては，非癌化形質が優性である。よって初代培養細胞には癌化を抑制する機構が存在すると考えられる。この機構に関与する遺伝子を単離する目的で，HPV18E6E7により癌化した3Y1細胞にREF cDNA libraryを形質導入し，10種のrevertant細胞をえた。

そのうちの1つであるR31から回収したp31XN7は，再び癌化形質を示すようになった細胞中では選択的に欠失しており，このcDNAの発現が癌化を抑制している可能性が示唆された。plasmid回収の際のcDNA中のrearrangeの可能性があるので，p31XN7 cDNAをプローブとして，REF cDNA libraryをスクリーニングして1.5kbのcDNAをもつN31を新たに回収した。N31の過剰発現により18T3Y1の軟寒天培地中でのコロニー形成能は減少した。sequenceの結果，N31は各frameに終止コドンを多数含み，予想されるopen reading frameは短いものであることがわかった。最近，タンパクをコードせずにRNAとして機能すると考えられているH19が癌抑制能力をもつことが報告された。N31についてもタンパクとして機能するのかRNAとして機能するのか検討中である。N31は各種のゲノムDNAで対するsouthern blotにより種間で保存されていることが示唆され，生物学的に意義のある遺伝子と考えられる。

論文審査の結果の要旨

ラットをはじめヒト初代培養細胞中には，ヒトパピローマウイルスの癌遺伝子であるE6E7のトランスフォーム活性を抑制する遺伝子の存在が示唆されている。本研究は，これらの遺伝子を単離する目的で行われた。ラット初代培養細胞のcDNA発現ライブラリーを，E6E7によりトランスフォームした細胞に形質導入し，10種の独立したリバータント細胞をえた。これらのリバータントの1つから，回収したcDNAは，その過剰発現によりE6E7で癌化した細胞のトランスフォーム活性を抑制することを示した。また,このcDNAの塩基配列を決定し，そのhomologがヒトにも存在する可能性を示した。一般にヒトパピローマウイルスの感染から子宮頚癌発生までには，長い潜伏期間が必要であり，同ウイルスによる発癌には宿主細胞の遺伝子変化が必要と考えられる。本研究は，これらの遺伝子変化を明らかにするとともに，子宮頚癌発生機構の解明に重要な知見を提供するものと考えられる。

以上のことから本論文は学位に価するものと思われる。